

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020030080429 A
(43)Date of publication of application: 17.10.2003

(21)Application number: 1020020019032
(22)Date of filing: 08.04.2002

(71)Applicant: AMOREPACIFIC CORPORATION
(72)Inventor: YUM, MYEONG HUN
KANG, BYEONG YEONG
YOO, BYEONG HUI
SUNG, DAE SEOK
JU, HUI GYEONG
HAN, SANG HUN
KIM, HAN GON

(51)Int. Cl. A61K 7/48

(54) MICROEMULSION PARTICLE CONTAINING 20-0- α -L-ARABINOPYRANOSYL(1- β -D-GLUCOPYRANOSYL-20(S)-PROTOPANAXADIOL AND EXTERNAL PREPARATION COMPOSITION OF SKIN USING THE SAME

(57) Abstract:

PURPOSE: A microemulsion particle containing 20-0- α -L-arabinopyranosyl(1- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol separated from bioconversion of ginseng saponin is provided. The external preparation composition of skin using the same has an excellent effect of preventing skin aging, such as wrinkle improvement.

CONSTITUTION: The microemulsion particle contains 10^{-8} to 99.9999% by weight of 20-0- α -L-arabinopyranosyl(1- β -D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol of the formula 1 as an effective ingredient and liposome containing lecithin, lecithin derivatives and a co-emulsifier, based on the total weight of the particle. In formula, R2 is OH and R3 is H. The microemulsion particle is prepared from acid hydrolysis, base hydrolysis or enzymolysis of ginseng extract and ginseng saponin. The cosmetic and pharmaceutical composition having excellent effects of proliferating skin cells and promoting collagen biosynthesis is obtained by formulation of the microemulsion particle.

COPYRIGHT KIPO 2004

Legal Status

Date of final disposal of an application (00000000)

Date of registration (00000000)

Date of opposition against the grant of a patent (00000000)

(19)대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)

(51) . Int. Cl.⁷
A61K 7/48

(11) 공개번호 특2003-0080429
(43) 공개일자 2003년10월17일

(21) 출원번호 10-2002-0019032
(22) 출원일자 2002년04월08일

(71) 출원인 주식회사 태평양
서울 용산구 한강로2가 181

(72) 발명자 유병희
경기도수원시팔달구영통동청명주공아파트401동201호

강병영
서울특별시서초구반포4동미도1차아파트308동1503호

염명훈
경기도용인시수지읍죽전리832번지벽산아파트109동403호

성대석
서울특별시동대문구청량리1동미주아파트4동817호

주희경
서울특별시도봉구쌍문4동한양아파트604동210호

한상훈
경기도수원시장안구율전동276-3천록아파트2동203호

김한곤
경기도수원시팔달구우만동29주공아파트203동902호

(74) 대리인 윤동열
이선희

심사청구 : 없음

(54) 나노유화기술에 의해20-O-[α -L-아라비노피라노실(1-> 6)-β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유하는 미세 유화 입자및 이를 사용한 피부 외용제 조성물

요약

본 발명은 생전환(bioconversion)법에 의하여 제조된 인삼의 주요대사산물인 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)-β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 주요 유효성분으로 하고, 나노유화기술을 사용하여 미세한 유화입자 및 리포솜 내부에 상기 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)-β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유시킴으로써 피부흡수를 극대화한 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고압유화기술 및 용매추출법등의 나노유화기술을 이용하여 레시틴 등의 피부친화성이 우수한 유화제와 함께 미세한 유화입자 및 리포솜 내에 상기 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)-β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유시키는 방법 및 이를 제형화함으로써 경피흡수율을 크게 향상시켜 우수한 피부세포 증식 및 콜라겐 생합성 촉진 효과를 갖는 피부 노화방지용 화장품 및 의약품 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 2

색인어

20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올 * 피부 노화방지 * 나노유화기술 * 레시틴 * 인삼 사포닌

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 비교예 1의 콜라겐 생합성 효능 측정 결과를 보여주는 피부세포 조직도이다.

도 2는 실시예 1의 콜라겐 생합성 효능 측정 결과를 보여주는 피부세포 조직도이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 생전환(bioconversion)법에 의하여 제조된 인삼의 주요대사산물인 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 나노유화기술을 사용하여 미세한 유화입자 및 리포솜 내에 함유시킴으로써 피부흡수를 극대화한 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고압유화 및 용매추출법 등의 나노유화기술을 이용하여 레시틴 등의 피부친화성이 우수한 유화제와 함께 미세한 유화입자 및 리포솜 내에 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유시키는 방법 및 이를 제형화함으로써 경피흡수율을 크게 향상시켜 우수한 피부세포 증식 및 콜라겐 생합성 촉진 효과를 갖는 피부 노화방지용 화장품 및 의약품 조성물에 관한 것이다. 또한, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 제형화함에 있어서 미세한 유화입자 및 리포솜 외에 500nm 이상 1000 μ m 이하의 일반유화입자에 포집하여 사용하거나, 오일에 용해하여 그대로 사용하거나, 캡슐화하여 사용할 수도 있다. 제형화 기술의 일반적인 방법을 포함한 미세유화기술을 적용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 효능을 화장품 및 의약품으로서 응용하기 위한 모든 방법을 의미한다.

피부는 인체의 일차 방어막으로서 체내의 제기관을 온도 및 습도 변화와 자외선, 공해물질 등 외부환경의 자극으로부터 보호해 주며, 체온조절 등의 생체 항상성 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나, 외부로부터 받는 과도한 물리적·화학적 자극, 스트레스 및 영양결핍 등은 피부의 정상기능을 저하시키고 탄력손실, 각질화, 주름생성 등의 피부 노화현상을 촉진시키게 되는데, 이러한 현상을 방지하고 보다 건강하고 탄력있는 피부를 유지하기 위하여 종래 각종 동물, 식물, 미생물 등으로부터 얻은 생리활성물질들이 강화된 화장품을 사용함으로써 피부의 고유기능을 유지시키고 피부세포를 활성화시켜 피부노화를 효과적으로 억제하기 위한 노력이 있어 왔다.

그러나, 기존의 화장품 원료들은 효능이 미진하거나 피부 부작용을 유발하는 등 여러 가지 문제점을 가지고 있었다.

따라서, 피부 부작용을 유발하지 않으면서 피부 노화방지 효과를 갖는 원료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 중 인삼 추출물에 대한 관심은 매우 높아 꾸준한 연구가 진행되고 있다. 그간의 인삼추출물에 대한 연구방향을 살펴보면, 인삼추출물(ginseng extract)에서 인삼 사포닌(ginseng saponin)의 추출, 인삼 어글리콘(aglycon)의 제조 및 인삼 사포닌의 정제를 통해 인체내부에서의 주요 대사산물인 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 제조, 분리 정제하는 방향으로 전개되었다.

인삼 사포닌은 담마란(dammarane) 타입의 트리테르펜(triterpene)인 비당부의 R1, R2 및 R3 위치의 알코올성 OH 기에 글루코스(glucose), 람노스(rhamnose), 자일로스(xylose) 및 아라비노스(arabinose)와 같은 당류가 에테르결합된 구조를 가지며, 현재까지 인삼에서 총 29종이 밝혀졌다. 상기 인삼 사포닌의 각 성분은 1964년 Shibata가 인삼에 함유된 배당체란 뜻으로 진세노사이드(ginsenoside)라 명명하였으며, 박충크로마토그래피(TLC)에서 분리된 이동거리 순으로 올레아닌(oleanine)계 사포닌인 진세노사이드-Ro와 진세노사이드-Ra, -Rb1, -Rb2, -Rc, -Rd, -Re,

-Rf, -Rg1, -Rg2, -Rg3 및 -Rh등으로 명명하였다.

이러한 인삼 사포닌은 750여종의 식물에 함유된 다른 식물의 사포닌과는 화학구조가 상이할 뿐 아니라 약리효능도 다른 것으로 밝혀졌다. 특히, 인삼사포닌은 약성이 매우 온화하고 과량투여에 의한 독성이 없을 뿐만이 아니라 용혈 작용도 거의 없다는 것이 밝혀졌다.

또한 인삼 사포닌을 인지질과의 복합체인 리포솜(liposome)형태로 인체피부에 도포한 결과 노화된 피부에 활력을 주며, 탄력성증가, 수화성증가와 피부의 혈액순환 촉진 등의 효과가 있음이 보고되었다(Curri, SB, Gezz, Z, Longhi, M G, Castelpietra, R : Fitoterapia, 57, 217(1986)) (Gezzi, A, Longhi, MG, Mazzoleni, R, Curri, SB : Fitoterapia, 57, 15(1986)) (Bombardelli, E. Curri, SB, Gariboldi, PL : Proc. 5th Intl. Ginseng Sym. Seoul Korea, 11(1988))

이후, 인삼 사포닌을 노화억제제품의 원료로 응용하기 위하여, 인삼 사포닌의 효능을 유지하고, 특히 피부 투과성을 증가시킨 생전환(bioconversion)된 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 피부에서의 효능을 확인하였다.

상기한 인삼추출물 및 인삼 사포닌을 이용한 사례로써, 화장료(미국특허 5,565,207, 5,567,419, 5,578,312, 5,663,160, 5,626,868, 5,753,242, 5,747,300, 5,853,705, 6,027,728, 6,063,366, 6,221,372, 6,228,378), 의약품(미국특허 5,569,459, 5,571,516, 5,587,167, 5,674,488, 5,665,393, 5,629,316, 5,776,460, 5,739,165, 5,916,555, 6,071,521, 6,083,512, 6,255,313) 및 분리, 정제기술(미국특허 5,591,611, 5,591,612, 5,736,380, 5,789,392, 5,780,620, 5,922,580, 5,935,636, 6,132,726, 6,156,817, 6,207,164) 등에 관한 많은 연구결과가 보고되었다.

그러나, 인삼 사포닌은 담마란 타입에 R1, R2 및 R3 위치의 알코올성 OH기에 당류가 에테르결합으로 연결된 구조를 가지고 있어 친수성이 크며, 분자량이 커짐에 따라, 이로 인해 피부 투과성 및 흡수성이 낮으며, 인삼 사포닌 자체에 친수성을 성질을 가지고 있어 피부의 각질층을 통과하지 못하여 인삼 사포닌이 피부 내부로의 유입이 어려운 문제점이 있었다.

한편, 최근에는 사포닌의 대사물에 관한 연구가 진행되면서, 인삼 사포닌의 효능이 사포닌 자체보다는 사포닌이 장내 세균에 의해 분해된 장내세균 대사물이 활성본체임이 시사되어지고 있으며, 이에 인삼의 사포닌 성분 중 어글리콘에 당(글루코스)이 하나 붙은 구조로 이루어진 진세노사이드 Rh1, Rh2 및 F1, 화합물 K 및 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올 등이 암세포증식 억제작용, 종양증식 억제작용, 항암제의 항암활성 증대작용 등의 약리작용이 있는 것으로 알려지고 있다.

인삼 사포닌으로부터 당의 일부를 제거하여 두 개의 당이 붙은 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올에 관한 연구가 활발히 진행되고는 있으나, 아직까지 이를 피부에 도입시키는 기술 및 제형화 기술에 관하여는 연구된 바 없었다. 또한 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 생리활성효과를 응용하기 위하여 사용되는 제형화기술에는 제한이 없으나, 일반유화기술을 이용한 500nm에서 1000um이하의 일반유화입자 및 미세유화기술을 이용한 500nm이하 30nm이상의 미세유화입자, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올을 포집하여 캡슐화하는 방법등이 가능할 것으로 생각하였다.

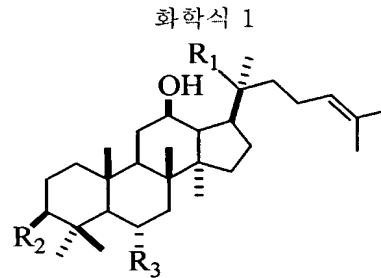
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에 본 발명에서는 인삼 정제 사포닌으로부터 생전환법에 의해 분리 정제된 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 주요 유효성분으로 하며, 피부친화성 유화제 및 나노유화기술을 사용하여 미세한 유화입자 및 리포솜 내부에 함유시킴으로써 우수한 피부세포 증식 및 콜라겐 생합성 촉진 효과를 갖는 피부노화 방지용 화장료 및 의약품 조성물을 제공하고자 한다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 생전환(bioconversion)법에 의하여 제조된 인삼의 주요대사산물인 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 나노유화기술을 사용하여 미세한 유화입자 및 리포솜 내에 함유시킴으로써 피부흡수를 극대화한 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고압유화법, 용매추출법 등의 나노유화기술을 이용하여 레시틴 등의 피부친화성이 우수한 유화제와 함께 미세한 유화입자 내에 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 함유시키는 방법 및 이를 제형화함으로써 경피흡수율을 크게 향상시켜 우수한 피부세포 증식 및 콜라겐 생합성 촉진 효과를 갖는 피부 노화방지용 화장료 및 의약품 조성물에 관한 것이다.

상기의 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올은 하기 화학식 1로 표현된다.



상기에서 R_1 은 O-Glc 6 - 1 Arap(아라비노피라노실)이고, R_2 는 OH이며, R_3 는 H이다.

일반적으로 효과적인 피부투과를 위해서는 친수성의 성질을 지니고 있는 물질보다는 소수성의 물질이 더 효과적이다. 이는 피부의 각질층 중에 분포되어 있는 세라미드를 포함한 세포간 지질 사이를 통과하기 위해서는 친수성의 물질 보다는 소수성의 물질이 세포간 지질과의 상호작용에 더 효과적이며, 따라서 보다 자유롭게 피부 최외각 층을 통과할 수 있기 때문이다.

상기의 화학식 1에서 보여주듯이 본 발명에서 사용하는 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올은 일반적인 인삼 사포닌에서 당의 일부를 제거함으로써 분자량을 줄이고, 소수성인 것을 특징으로 하고 있다.

이하 본 발명을 보다 상세하게 설명하면 다음과 같다.

본 발명에서 사용된 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올은 인삼 정제 사포닌을 산, 알칼리 또는 효소 등으로 가수분해하여 인삼 사포닌으로부터 당을 제거한 후 반응액을 실리카겔럼에 통과하여 제조한다.

여기에서 사용하는 효소는 사포닌 당결합을 분해하는 β -글루코스 분해효소(β -glucosidase), α , β -아라비노스 분해효소(α , β -arabinosidase), α , β -람노스 분해효소(α , β -rhamosidase) 등 엑소 당결합 분해효소 및 이들을 함유하고 있는 복합효소제 등이다.

본 발명의 별도의 나노유화기술을 적용하지 않고, 일반적인 오일에 용해하여 제형화하는 것도 가능하며, 미세한 유화입자 및 리포솜의 제조시에는 내부에 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올 가 유화입자 및 리포솜 총 중량에 대하여 10⁻¹⁰ ~ 70중량%의 양으로 함유되며, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유한 미세 유화입자는 제법에 따라 차이가 있지만 화장료 조성물 총 중량에 대해서 10⁻¹⁰ ~ 99.99중량%의 양으로 함유된다. 이와 같이 미세 유화입자 내부에 포집하는 기술을 적용하는 방법 외에 500nm에서 1000um의 입경을 가지는 일반적인 유화방법에 의한 유화입자 및 캡슐내부에 포집하거나, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 용해시킬 수 있는 오일에 용해하여 사용할 수 있다.

본 발명의 미세한 유화입자는 그 입경이 500nm 내지 30nm 정도이고, 바람직하게는 300nm 내지 50nm 정도가 적당하다. 통상의 유화입자의 경우, 최소 500nm 이 상의 크기를 갖지만, 본 발명의 미세 유화입자 및 리포솜은 피부와의 접촉면적이 상대적으로 증가함으로써 경피흡수 가능 면적도 증가하게 된다. 또한, 피부 각질층의 세포간 지질사이의 틈이 약 50nm 내외라는 점과 유화입자의 유화막이 유연성을 가진다는 점을 감안하여, 본 발명의 미세 유화입자가 세포간 지질 내로의 흡수, 확산이 용이하도록 하였다.

즉, 나노유화기술에 의하여 제조된 평균입경 300nm 내지 50nm의 유화입자는 피부와의 접촉면적의 증가 및 세포간 지질로의 침투 및 확산이라는 두 가지 경로를 통해, 미세 유화입자 자체 또는 유화입자 내부의 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 경피흡수율을 높여주게 된다.

한편, 본 발명에서 사용되는 유화제인 레시틴은 유화 입자 총 중량의 0.5~5중량%, 바람직하게는 2~3중량%가 함유

되며, 레시틴의 구성성분은 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine), 라이조포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine), 포스파티딜에탄올아민(phosphatidylethanolamine) 등의 불포화 콜린계, 세린계, 에탄올아민계 화합물 및 이들의 수소첨가물 형태를 포함하고 있다.

또한, 본 발명에서 레시틴과 함께 사용되는 보조유화제로는 음이온계, 양이온계, 비이온계 또는 양성이온계 유화제가 가능하며, 사용되는 레시틴의 함량 및 구성성분에 따라 레시틴 함량 대비 0.5~5배, 바람직하게는 1~3배의 비율로 사용한다.

또 나노유화기술로서 고압유화방법(압력이 500~2,500bar) 및 용매추출방법을 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 함유한 미세 유화 입자를 제조한다.

본 발명에 따른 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이가 함유된 피부 노화방지용 화장품 및 의약품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없다. 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일 및 보디에센스, 메이컵 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스, 보디 세정제, 치약, 구강청정액 등의 화장품 및 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 또는 분무제 등의 의약품으로 제형화될 수 있다.

이하, 실시예 및 시험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다.

[참고예 1] 인삼 정제 사포닌의 제조

홍삼 2kg에 물, 물을 포함한 에탄올 4ℓ를 넣고, 77℃에서 3회 환류 추출한 후, 15℃에서 6일간 침적시켰다. 그 후, 여과포 여과와 원심분리를 통해 잔사와 여액을 분리하고, 분리된 여액을 감압농축하여 얻은 엑기스를 물에 현탁한 후에, 에테르 1ℓ로 5회 추출하여 색소를 제거하고, 수층을 1-부탄올 500ml로 3회 추출하였다. 이로부터 얻은 총 1-부탄올층을 5% KOH로 처리한 다음 증류수로 세척한 뒤, 감압농축하여 1-부탄올 엑기스를 얻고, 이를 소량의 메탄올에 녹인 다음, 대량의 에틸아세테이트에 추가하여, 생성된 침전물을 건조함으로써, 인삼 정제 사포닌 100g(수율: 5%)을 얻었으며, 동일조작을 10회 반복하여 총 1kg의 인삼 정제 사포닌을 준비하였다.

[참고예 2] 산 가수분해 방법에 의한 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의 제조

참고예 1에서 얻은 인삼 정제 사포닌 100g에 20배(v/w)의 7% 황산/50% 에탄올 용액(v/w)을 가하여, 100℃ 수욕조에서 6시간 동안 가열 환류시켜, 인삼 사포닌에 결합된 당결합을 가수분해시켰다. 반응액을 감압농축하여 용매를 제거하고, 잔사에 증류수(1,000ml)를 가해 현탁시킨 후, 동량의 에테르로 3회 추출하였다. 총 에테르층을 증류수로 세척한 뒤, 무수황산마그네슘(MgSO₄)으로 탈수, 여과, 농축하여 조생성물을 얻었다. 얻은 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=9:1 --> 4:1로 점차 극성을 증가시켜주면서 분리)로 분리하였으며, 각 분획에 대하여 박막크로마토그래피(클로로포름/메탄올/물 = 65/35/10, R_f = 0.49)를 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의 분획을 분리, 회수하여 최종적으로 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 700mg(수율 0.7%)을 얻었다.

[참고예 3] 염기 가수분해 방법에 의한 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의 제조

참고예 1에서 얻은 인삼 정제 사포닌 100g을 건조피리딘(5000ml)에 녹이고, 여기에 소듐 메톡사이드(분말, 100g)를 가해 유욕상에서 8시간 동안 환류 반응시킴으로써, 사포닌의 당결합을 가수분해시켰다. 반응액을 감압농축하여 용매를 제거하고, 잔사에 증류수(1,000ml)를 가해 현탁시킨 후, 동량의 에테르로 3회 추출하였다. 총 에테르층을 증류수로 세척한 뒤, 무수황산마그네슘(MgSO₄)으로 탈수, 여과, 농축하여 조생성물을 얻었다. 얻은 조생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=9:1 --> 4:1로 점차 극성을 증가시켜주면서 분리)로 분리하였으며, 각 분획에 대하여 박막크로마토그래피(클로로포름/메탄올/물 = 65/35/10, R_f = 0.49)를 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의 분획을 분리, 회수하여 최종적으로 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 850mg(수율 0.85%)을 얻었다.

[참고예 4-1] 효소분해방법을 통한 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의 제조

참고예 1에서 얻은 인삼 정제 사포닌 100g을 1000ml의 시트레이트 완충용액(pH 5.5)에 용해시키고, 여기에 페니실린 속에서도 분리한 나린지나제 효소 1g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 48시간 동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨

다음, 반응액은 동량의 에테르로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=9:1 --> 4:1로 점차 극성을 증가시켜주면서 분리)로 분리하였으며, 각 분획에 대하여 박막크로마토그래피(클로로포름:메탄올/물 = 65/35/10, Rf = 0.49)를 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 분획을 분리, 회수하여 최종적으로 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올 1400mg (수율 1.4%)을 얻었다.

[참고예 4-2]

인삼 정제 사포닌 100g을 15% 에탄올을 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 1000ml에 용해시키고, 여기에 페니실리움속에서 분리한 나린지나제 효소 0.5g을 첨가하여 40℃ 수욕상에서 48시간 동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=9:1 --> 4:1로 점차 극성을 증가시켜주면서 분리)로 분리하였으며, 각 분획에 대하여 박막크로마토그래피(클로로포름:메탄올/물 = 65/35/10, Rf = 0.49)를 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 분획을 분리, 회수하여 최종적으로 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올 900mg(수율 0.9%)을 얻었다.

[참고예 4-3]

인삼 정제 사포닌 100g을 15% 에탄올을 함유한 시트레이트 완충용액(pH 4.0) 1000ml에 용해시키고, 여기에 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 효소 2g을 첨가하여 30℃ 수욕상에서 48시간 동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에틸아세테이트로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=9:1 --> 4:1로 점차 극성을 증가시켜주면서 분리)로 분리하였으며, 각 분획에 대하여 박막크로마토그래피(클로로포름:메탄올/물 = 65/35/10, Rf = 0.49)를 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 분획을 분리, 회수하여 최종적으로 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올 1100mg(수율 1.1%)을 얻었다.

[참고예 4-4]

인삼 정제 사포닌 100g을 1000ml의 시트레이트 완충용액(pH 5.5)에 용해시키고, 여기에 아스퍼질러스속에서 분리한 펙티나제 효소 2g을 첨가하여 30℃ 수욕상에서 48시간 동안 교반시키면서 반응시켰다. 박층크로마토그래피에 의해 주기적으로 확인하여, 기질이 완전히 소실되면 열수중에서 10분간 가열하여 반응을 종료시킨 다음, 반응액은 동량의 에테르로 3회 추출, 농축하였다. 얻은 생성물을 실리카겔 칼럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올=9:1 --> 4:1로 점차 극성을 증가시켜주면서 분리)로 분리하였으며, 각 분획에 대하여 박막크로마토그래피(클로로포름:메탄올/물 = 65/35/10, Rf = 0.49)를 사용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 분획을 분리, 회수하여 최종적으로 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올 1200mg(수율 1.2%)을 얻었다.

상기 참고예로부터 얻은 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올을 함유한 나노 유화 입자를 실시예 1 내지 실시예 3과 같이 제조하였다.

[실시예 1]

레시틴, 수첨레시틴, 콜레스테롤, 쿡기를 및 프로필렌글리콜에 용해시킨 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올을 70~75℃까지 가열하여 완전히 용해한 다음, 미리 가열된 수상파트(중류수, EDTA)와 혼합하여 일반 호모믹서로 선-유화(pre-emulsion)를 시키고(3분간, 3,000~6,000rpm) 고압유화기(Microfluidizer)를 사용하여 1,000Bar/3cycles로 시행하였다. 상기 성분에서 수첨레시틴의 경우 에멀전의 안정도는 우수하지만 피부흡수적인 측면에서 불포화 레시틴에 비해 피부친화도가 떨어지므로, 두 가지의 레시틴을 혼합하여 사용하였다.

[실시예 2]

레시틴, PEG-5 레이프씨드(rapeseed) 스테롤, 카프릭/카프릴릭 트리글리세리드, BHT, α -토코페롤 및 펜틸렌글리콜과 에탄올에 용해시킨 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1->6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올을 70~75℃까지 가열하여 완전히 용해한 다음, 미리 가열된 수상파트(중류수, EDTA)와 혼합하여 일반 호모믹서로 선-유화를 시키고(3분간, 3,000~6,000rpm), 고압유화기를 사용하여 1,000Bar/3cycles로 시행하였다. 여기에서, 불포화 레시틴의 화학적 불안정성을 보완하기 위한 항산화제로써 BHT를 첨가하였으며, 유화 안정도를 증가시키

기 위한 보조 유화제로써 PEG-5 레이프씨드(rapeseed) 스테롤을 첨가하였다.

[실시예 3]

수첨레시틴, 수첨 라이조포스파티딜콜린(HLPC) 및 프로필렌글리콜과 에탄올에 용해시킨 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 70~75℃까지 가열하여 완전히 용해한 다음, 미리 가열된 수상파트(증류수, EDTA, 글리세린, 베타인)와 혼합하여 일반 호모믹서로 유화시키고(3분간, 3,000~6,000rpm) 실온으로 냉각하였다. 참고로, 상기 성분 중, 수첨 라이조포스파티딜콜린은 수첨레시틴을 구성하고 있는 성분 중 수첨 포스파티딜콜린(HPC)이 가수분해되면서 생기는 성분이며, HPC보다 유화력이 우수하다.

상기의 실시예 1 내지 실시예 3에서 제조한 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 함유한 미세 유화입자 및 리포솜과 일반유화물을 제조하고, 각각의 경피흡수 차이를 비교하기 위하여 인삼 정제 사포닌을 함유한 비교예 1 내지 비교예 3을 제조하였으며, 그 내용을 정리하면 다음의 표 1과 같다. 하기의 표1에서 실시예 1과 실시예 2 및 비교예 1과 비교예 2는 미세유화입자를 제조하기 위하여 고압유화방식을 사용하였으며, 실시예 3 및 비교예 3은 일반 호모믹서를 사용하여 일반적인 유화입자가 형성되도록 하였다.

[표 1]

성분	실시예			비교예		
	1	2	3	1	2	3
수첨 레시틴	1.5	-	2.5	1.5	-	2.5
레시틴	3.0	2.0	-	3.0	2.0	-
PEG-5 레이프씨드 스테롤	-	4.0	-	-	4.0	-
세테아레스-10	-	-	-	-	-	-
카프릭/카프릴릭 트리글리세리드	-	7.5	-	-	7.5	-
수첨 라이조포스파티딜콜린	-	-	0.15	-	-	0.15
콜레스테롤	1.5	-	-	1.5	-	-
콩기름	7.5	-	-	7.5	-	-
펜틸렌 글리콜	-	5.0	-	-	5.0	-
프로필렌 글리콜	5.0	-	4.0	5.0	-	4.0
에탄올	-	7.5	6.5	-	7.5	6.5
20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를	1.5	1.5	1.5	-	-	-
인삼 정제 사포닌	-	-	-	1.5	1.5	1.5
알파토코페롤	-	0.2	-	-	0.2	-
부틸히드록시톨루엔	-	0.01	-	-	0.01	-
EDTA	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
글리세린	-	-	4.0	-	-	4.0
베타인	-	-	1.0	-	-	1.0
증류수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

이하, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 함유하는 미세 유화입자 및 리포솜 혹은 일반 유화입자를 제형화한 피부 외형제 조성물을 설명하면 다음과 같다.

[처방예 1] 크림제형

조성	제형예 1	제형예 2	제형예 3	비교 제형예 1	비교 제형예 2	비교 제형예 3
실시예 1	10.0	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10.0	-	-	-	-
실시예 3	-	-	10.0	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10.0	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10.0	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10.0
밀납	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
폴리솔베이트 60	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
솔비탄세스퀴올리에이트	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
PEG60 경화피마자유	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
유동파라핀	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
스쿠알란	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
카프릴릭/카프락 트리글리세라이드	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
글리세린	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
부틸렌글리콜	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
프로필렌글리콜	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
트리에탄올아민	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
방부제	적량	적량	적량	적량	적량	적량
색소	적량	적량	적량	적량	적량	적량
향료	적량	적량	적량	적량	적량	적량
정제수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

[처방예 2] 영양화장수

조성	제형예 4	제형예 5	제형예 6	비교 제형예 4	비교 제형예 5	비교 제형예 6
실시예 1	10.0	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10.0	-	-	-	-
실시예 3	-	-	10.0	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10.0	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10.0	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10.0
세틸에틸헥사노에이트	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
세토스테아릴알콜	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
친유형모노스테아린산 스테아레이트	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
스쿠알란	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
폴리솔베이트 60	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
솔비탄세스퀴올리에이트	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

글리세린	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
트리에탄올아민	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
카르복시비닐폴리머	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
방부제	미량	미량	미량	미량	미량	미량
색소	미량	미량	미량	미량	미량	미량
향료	미량	미량	AL량	미량	미량	미량
정제수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

[처방예 3] 유연화장수

조성	제형예 7	제형예 8	제형예 9	비교 제형예 7	비교 제형예 8	비교 제형예 9
실시예 1	10.0	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10.0	-	-	-	-
실시예 3	-	-	10.0	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10.0	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10.0	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10.0
베타인	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
낫토검	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
셀룰로오스검	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
에탄올	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
폴리옥시에틸렌 경화피마자유	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
초산토코페롤	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
방부제	미량	미량	미량	미량	미량	미량
색소	미량	미량	미량	미량	미량	미량
정제수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

[처방예 4] 젤

조성	제형예 10	제형예 11	제형예 12	비교 제형예 10	비교 제형예 11	비교 제형예 12
실시예 1	10.0	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10.0	-	-	-	-
실시예 3	-	-	10.0	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10.0	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10.0	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10.0
디소듐에틸렌디아민 테트라아세테이트	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02

에톡시글리콜	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
폴리아크릴레이트	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00	20.00
에탄올	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00	30.00
수소첨가피마자유	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
페닐트리메치콘	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
트리에탄올아민	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
향	미량	미량	미량	미량	미량	미량
정제수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

[처방예 5] 연고

조성	제형예 13	제형예 14	제형예 15	비교 제형예 13	비교 제형예 14	비교 제형예 15
실시예 1	10.0	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10.0	-	-	-	-
실시예 3	-	-	10.0	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10.0	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10.0	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10.0
카프린/카프릴 트리글리세리드	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
엑사파라핀	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
솔비탄세스퀴올리에이트	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
옥틸도데세스-25	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0
세틸에틸헥사노에이트	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
스쿠알란	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
살리실산	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
글리세린	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
솔비톨	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
증류수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

[처방예 6] 분무제

조성	제형예 16	제형예 17	제형예 18	비교 제형예 16	비교 제형예 17	비교 제형예 18
실시예 1	10	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10	-	-	-	-
실시예 3	-	-	10	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10

트리에탄올아민	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
폴리비닐피롤리돈/ 비닐아세테이트	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
글리세린	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
폴리아크릴레이트	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
증류수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

상기 처방을 펌프용기에 담아 사용한다.

[처방예 7] 패치

조성	제형예 19	제형예 20	제형예 21	비교 제형예 19	비교 제형예 20	비교 제형예 21
실시예 1	10	-	-	-	-	-
실시예 2	-	10	-	--	-	-
실시예 3	-	-	10	-	-	-
비교예 1	-	-	-	10	-	-
비교예 2	-	-	-	-	10	-
비교예 3	-	-	-	-	-	10
폴리비닐알콜	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
폴리비닐피롤리돈	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
소듐폴리아크릴산	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
소듐알지네이트	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
레티닐팔미테이트	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
부틸렌글리콜	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
황산 콘드로이친	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
치마버섯추출물	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
메도폼오일	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
PEG(20)솔비탄스테아레이트	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BHT	미량	미량	미량	미량	미량	미량
산화아연	미량	미량	미량	미량	미량	미량
증류수	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100	to 100

[시험예 1] 경피흡수량 측정 시험

피부 흡수는 기네아피그 피부를 대상으로 프란츠 투과셀을 이용하여 측정하였다. 시험 직전, 기네아피그의 복부 부분 피부를 채취하여, 평방 1cm²의 면적으로 절단한 후, 이를 투과경의 직경이 0.9cm인 투과셀에 장치하고, 클램프로 고정하였다. 피부의 한쪽면(donor 용기)은 상기한 실시예 1~3 및 비교예 1~3를 0.05ml 취하여 0.5ml가 되도록 증류수로 희석하고, 제형예 1~15 및 비교제형예 1~15의 경우에는 0.5ml를 넣어주었다. 반대쪽면(receptor 용기)은 정제수와 에탄올이 4:1 중량비로 혼합된 용매와 접촉하도록 하였으며, 시험시 온도는 실제 피부 온도인 32℃를 유지하였다. 시험 시작 후, 일정 시간 간격으로 용매의 일부를 채취한 후, HPLC를 이용하여 피부에 흡수된 20-O-[α-L-아라비노피라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이의올의 양을 측정하여, 도포 농도당 피부흡수량(μg/cm²/중량%)으로 나타내었으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 인삼 정제사포닌에 대해서는 경피흡수된 사포닌의 함량을 정량하였으며, 20-O-[α-L-아라비노피라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙

사다이드올의 경우에는 경피흡수된 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이드올의 함량을 정량 분석하여 총 경피흡수량을 계산하였다.

<HPLC 분석조건>

- Column : C18(ODS)
- Solvent Flow : 1ml/min
- Detection UV : 203nm
- Sample test concentration : 5mg/ml
- Sample injection amount : 10 μ g
- Eluent : Gradient condition
- A : Acetonitrile/D.I. water=15/85
- B : Acetonitrile/D.I. water=80/20

<용매 구배 조건>

시간(분)	A(%)	B(%)
0	100	
10	70	30
25	50	50
40		100
70		100

[표 2a]

실시예	경과시간(hr)				비교예	경과시간(hr)			
	0	4	8	12		0	4	8	12
1	0	15.15	28.98	33.13	1	0	3.52	8.11	14.41
2	0	16.02	26.14	34.21	2	0	3.66	8.35	14.06
3	0	14.59	20.25	25.32	3	0	3.35	5.04	10.95

[표 2b]

제형예	경과시간(hr)				비교제형예	경과시간(hr)			
	0	4	8	12		0	4	8	12
1	0	12.12	24.00	35.21	1	0	2.51	3.98	4.68
2	0	11.25	21.63	33.74	2	0	1.15	2.62	3.86

3	0	2.21	3.86	5.40	3	0	0.48	1.01	2.03
4	0	15.98	31.86	31.97	4	0	2.62	3.21	5.93
5	0	11.45	27.63	32.71	5	0	2.24	3.53	5.92
6	0	2.24	3.75	5.11	6	0	0.45	0.97	1.97
7	0	14.30	28.59	33.99	7	0	3.23	4.84	6.83
8	0	11.22	21.45	32.55	8	0	1.56	3.47	5.31
9	0	2.23	3.65	5.06	9	0	0.50	1.03	2.11
10	0	15.21	31.25	31.21	10	0	2.33	5.13	7.02
11	0	11.52	21.88	35.94	11	0	1.56	2.73	4.32
12	0	2.12	3.36	5.35	12	0	0.49	1.11	2.23
13	0	12.13	30.99	31.85	13	0	2.45	4.10	6.02
14	0	11.73	21.97	35.43	14	0	1.12	3.54	6.33
15	0	2.23	3.45	5.61	15	0	0.48	0.96	2.06

상기의 시험결과로부터 나노유화기술을 적용하여 제조한 유화입자의 경우인 실시예 1~2가, 일반유화 입자를 형성하는 실시예 3의 경우보다 우수한 경피흡수율을 보이고 있음을 확인할 수 있었으며, 사포닌을 나노유화기술을 사용하여 제조한 미세유화입자인 비교예 1 내지 비교예 2에 비해서 훨씬 높은 경피흡수율을 보임을 확인할 수 있었다. 특히, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올에 대해서 나노유화기술을 적용한 경우(실시예 1~2)에는 극적인 경피흡수율의 증가가 있음을 확인할 수 있었다.

또한, 각각의 대응하는 실시예 및 비교예를 통해서 볼 때, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올은 인삼 사포닌의 다른 글루코실 진세노사이드 류의 성분보다 경피흡수율이 높음을 알 수 있으며, 이는 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 화학적인 구조의 특징으로부터 유래한 것으로 볼 수 있다.

즉, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올은 인삼 정제 사포닌에 비해서 훨씬 높은 경피흡수율을 보이며, 특히, 피부친화성이 우수한 레시틴과 나노유화기술을 적용함으로써 월등한 경피흡수율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

또한, 이는 실시예 및 비교예를 제형화한 제형에 1~15 및 비교제형에 1~15를 통해서도 확인할 수 있으며, 나노유화기술 및 피부친화성이 우수한 레시틴의 사용으로 인한 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 경피흡수율이 제형내에서도 그대로 재현, 적용되고 있음을 확인할 수 있었다.

일반적으로 화장의 지속 시간이 4~8시간임을 감안하면, 인삼 정제 사포닌을 함유한 실시예 및 제형예에 비해서 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유한 실시예 및 제형예에서 경피흡수량이 월등히 우수함을 확인할 수 있다.

[시험예 2] 섬유아세포(Fibroblast)의 증식효능 측정

3.5%의 우태아 혈청이 함유된 DMEM(Doubecco's Modified Eagle's Media)배지에서 배양한 인체 섬유아세포를 96공 평판배양기(96-well microtiter plate)에 5,000세포/well이 되도록 분주하고, 시료로서 실시예 1의 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올, 비교예 1의 인삼 정제 사포닌을 각각 1%의 양으로 사용하고, 제형예 1 및 비교제형예 1을 각각 10%의 양으로 사용하여 배양배지로 1/10씩 순차적으로 희석하여 첨가한 후, 37℃ 온도에서 4일간 배양하였다. 배양 후 0.2% MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 각 웰당 50 μ l씩 첨가하고, 다시 37℃ 온도에서 4시간 동안 배양한 후 생성된 포르마잔(formazan)을 DMSO(Dimethyl sulfoxide)로 용해시켰다. 용해된 포르마잔의 흡광도를 평판배양측정기(microplate reader)를 이용하여 570nm에서 측정하였다. 이를 인삼 정제 사포닌과 바이오진을 처리하지 않은 대조군에 대하여 상기와 동일한 방법으로 실시하여 흡광도를 측정하였다. 인삼 정제 사포닌과 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 함유한 시험군과 이를 함유하지 않은 대조군의 흡광도를 각각 비교한 후, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[표 3]

시료농도(%)	섬유아세포 증식능(%)			
	실시에 1	비교예 1	제형예 1	비교제형예 1
1×10^{-8}	5	3	5	3
1×10^{-7}	16	5	12	6
1×10^{-6}	28	8	23	10
1×10^{-5}	45	13	44	13
1×10^{-4}	54	19	52	17
1×10^{-3}	66	25	64	23
1×10^{-2}	81	41	78	39
1×10^{-1}	98	47	95	43

표 3으로 부터, 인삼 정제 사포닌을 처리한 섬유아세포에 비하여, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 처리한 섬유아세포의 증식 효능이 훨씬 높음을 알 수 있었다. 또한, 각각의 실시예를 제형화한 제형예 1 및 비교 제형예 1의 경우에도 제형예 1이 비교 제형예 1보다 우수한 섬유아세포 증식효능이 있음을 확인할 수 있었다.

[시험예 3] 각질형성세포(Keratinocyte)의 증식효능 측정

각질형성세포를 사용하여 시험예 2에서와 동일한 방법으로 실시예 2 및 비교예 2 및 제형예 2 및 비교제형예 2에 대한 각질형성세포의 증식효능을 측정하여, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[표 4]

시료농도(%)	각질형성세포(Keratinocyte) 증식능(%)			
	실시에 2	비교예 2	제형예 2	비교제형예 2
1×10^{-8}	5	4	5	4
1×10^{-7}	13	6	13	6
1×10^{-6}	18	7	18	7
1×10^{-5}	25	11	25	11
1×10^{-4}	34	14	34	14
1×10^{-3}	39	19	38	18
1×10^{-2}	45	23	44	21
1×10^{-1}	53	27	51	25

상기 표 4에서 알 수 있는 바와 같이, 인삼 정제 사포닌을 처리한 각질형성세포에 비하여, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 처리한 각질형성세포는 약 2배정도 향상된 증식 효능을 나타냄을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 나노유화기술과 피부친화성 레시틴을 사용하여 제조한 실시예 및 이를 함유한 제형에서 동일한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[시험예 4] 시험관내(in vitro) 콜라겐 생합성 효능 측정

인체 섬유아세포를 24공 평판배양기에 배양한 후, 시험예 2와 동일한 방법을 사용하여 실시예 3, 비교예 1에 대해서 배양배지로 1/100씩 순차적으로 희석하여 첨가하고, 제형예 3, 비교제형예 3에 대해서 배양배지로 1/10씩 순차적으로 희석하여 첨가하였다. 배양 3일째 10%의 우태아 혈청이 함유된 DMEM배지를 각 웰당 0.5ml씩 첨가한 후 L[2, 3, 4, 5-3H]-프롤린 10 μ g Ci를 첨가하였다. 24시간 경과 후, 각 웰에 들어있는 배지와 세포들을 끓여모아 5% 트리클로로아세트산(TCA; Trichloroacetic acid) 용액에 넣어 수세한 후, 2개의 시험관에 분주하고, 1개의 시험관에는 타입 I 콜라게나제(type I collagenase) 1unit/ μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C 온도에서 90분간 배양하였으며, 다른 시험관은 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 그 후, 모든 시험관에 50% TCA를 0.05ml씩 첨가하고 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 방치한 다음, 각각 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 각각의 상등액과 침전물을 액체 신틸레이션 계수기(LSC; Liquid Scintillation Counter)로 디파임(DPM; decay per minute) 값을 얻어, 하기 수학적 1에 의거하여, 대조군과 시험군에 대해 콜라겐 생합성 값(RCB; Relative Collagen Biosynthesis)을 구하고, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

수학적 1

$$RCB = \frac{\text{콜라겐 } dpm}{(\text{전체콜라겐 } dpm - \text{콜라겐 } dpm) \times 5.4 + \text{콜라겐 } dpm} \times 100$$

[표 5]

시료농도(%)	콜라겐 생합성 증식능(%)			
	실시예 3	비교예 3	제형예 8	비교제형예 8
1 \times 10 ⁻⁸	5	2	2	2
1 \times 10 ⁻⁷	7	2	5	2
1 \times 10 ⁻⁶	11	4	9	4
1 \times 10 ⁻⁵	16	6	13	6
1 \times 10 ⁻⁴	21	10	17	9
1 \times 10 ⁻³	29	12	24	11
1 \times 10 ⁻²	38	16	31	15
1 \times 10 ⁻¹	44	20	36	19

상기 표 5의 결과로부터, 인삼 정제 사포닌을 처리한 섬유아세포에 비하여, 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 처리한 섬유아세포는 약 3배정도 향상된 콜라겐 생합성 촉진 효능을 나타냄을 알 수 있었으며, 이러한 결과는 나노유화기술을 사용하지 않은 경우에도 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올과 피부친화성 레시틴을 사용하여 제조한 실시예 및 이를 함유한 제형에서 동일한 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[시험예 5] 생체내(in vivo)에서의 콜라겐 생합성 효능 측정

탈모생쥐(Hairless mouse; 42주, female)에 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를(부형제; EtOH:PG=7:3)을 도포, 3일간 철폐하고, 24시간 휴식기를 둔 후, 3일간 반복 철폐하였다. 그 후 탈모생쥐의 피부를 생체검사(biopsy)하여 조직염색을 실시하였다. 조직염색은 타입 I pN 프로콜라겐(pro collagen), MMP-1(MMP-1(Matrix Metalloproteinase-1)에 대한 면역염색 및 헤마톡실린 앤 에오신염색(Haematoxylin and Eosin Staining)을 통해 프로콜라겐, MMP-1의 발현량 정성(정량) 및 피부(표피)두께의 변화를 관찰하여, 그 결과들도 1 및 도 2에 나타내었다.

도 1 및 도 2를 통해, 비교예 1보다는 실시예 1에서 콜라겐 생합성이 촉진되었음을 확인할 수 있었으며, 이는 피부친화성 레시틴 및 나노기술을 이용하여 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이를 피부내로 효과적으로 전달할 수 있음을 보여준다.

상기 결과로 인삼 정제 사포닌은 피부에 효과적인 흡수가 되지 않으며, 결과적으로 실시예 및 제형예에서 콜라겐 생합성 효과가 미미한 것을 확인할 수 있었다.

이는 인삼 정제 사포닌이 구조적으로 피부 흡수가 어려우며, 이는 피부친화성 레시틴의 사용이나 나노유화기술을 이용한 제형화에 의해서도 쉽게 극복되지 않음을 보여주는 결과이다.

즉, 상기의 시험 결과로부터, 경피흡수가 용이한 구조를 가지는 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 경피흡수에 있어 피부친화성 레시틴 및 나노유화기술을 사용함으로써, 극대화된 경피흡수가 가능하며, 결과적으로 효과적인 콜라겐 생합성이 이루어질 수 있음을 확인할 수 있었다.

[시험예 6] 인체 피부를 대상으로 한 피부 주름개선 효과

35~45세의 안면주름이 있는 시험대상자 30명 대하여, 상기 제형예 1 및 비교제형예 1의 크림제형을 주고, 피부주름 개선효과를 비교평가하게 하였다. 피검자의 안면 좌부에는 제형예 1의 크림을, 우부에는 비교제형예 1의 크림을 3개월간 사용하게 하였으며, 크림 사용 이전에 안면 양쪽부의 피부 상태를 측정해 놓고, 3개월 후 동일부위를 재측정하는 방법으로 피부주름의 변화를 측정하였다. 피부측정은 온도 24℃, 상대습도 40%의 항온습습실에서 하였으며, 눈꼬리 부위의 주름을 레플리카(replica)로 떼서 비시오메타 시스템(Visiometer system; C+K사)으로 피부주름을 측정하였다. 피부주름의 변화량은 하기 수학적 2에 따라 계산하였다.

$$\text{수학적 2} \\ \text{변화량}(\Delta\%) = \frac{(Tdi - Tdo)}{Tdo} \times 100$$

(상기 식에서, Tdi ; D₉₀에서의 측정부위 값이며, Tdo ; D₀에서의 측정부위 값이다.)

상기 식에 따라, 계산한 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[표 6]

	주름감소율($\Delta\%$)
제형예 1	56 \pm 15%
비교제형예 1	21 \pm 10%

발명의 효과

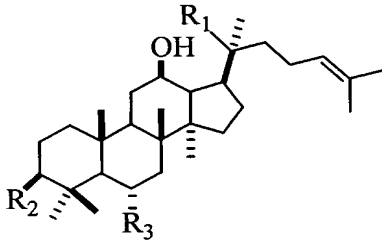
상기의 결과에서도 알 수 있듯이, 본 발명에서는 인삼 사포닌의 구조적 특징으로 인한 낮은 경피흡수율의 단점을 극복하기 위하여 당이 제거된 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 피부친화성 유화제 및 나노유화기술을 사용하여 미세한 유화입자 내부에 함유시킴으로써 경피흡수율을 극대화하였고, 주름감소 등 피부 노화 방지효과가 우수함을 알 수 있었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

인삼 사포닌을 생전환시켜 당을 제거시킴으로써 제조된 하기 화학식 1로 표현되는 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1 \rightarrow 6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올을 나노유화기술을 통해 유효성분으로 함유하는 미세 유화 입자.

[화학식 1]



상기에서 R_1 은 O-Glc 6 - 1 Arap(아라비노피라노실)이고, R_2 는 OH이며, R_3 는 H이다.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기의 유효성분인 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 함유량은 미세 유화 입자 총중량에 대하여 10^{-8} ~ 99.9999중량%인 것을 특징으로 하는 미세 유화 입자.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기의 유효성분인 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올의 함유량이 미세 유화 입자 총중량에 대하여 0.001~30 중량%인 것을 특징으로 하는 미세 유화 입자.

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 미세 유화 입자의 평균입경이 30nm 내지 500nm인 것을 특징으로 하는 미세 유화 입자.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 레시틴, 레시틴 유도체 및 보조유화제를 함유하는 리포솜을 포함하는 것을 특징으로 하는 미세 유화 입자.

청구항 6.

제 1항에 있어서, 상기 20-O-[α -L-아라비노피라노실(1→6)- β -D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사다이올은 인삼 추출물 및 인삼 정제사포닌을 산 가수분해, 염기 가수분해 또는 효소분해법의 공정을 통해 제조한 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 미세 유화 입자의 제조방법.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 효소분해법은 효소로 당결합을 분해하는 β -글루코스 분해효소(β -glucosidase), α , β -아라비노스 분해효소(α , β -arabinosidase), α , β -람노스 분해효소(α , β -rhamosidase) 등 엑소 당결합 분해효소 및 이들을 함유하고 있는 복합효소제를 사용하는 것을 특징으로 하는 미세 유화 입자의 제조방법.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 나노유화기술이 고압유화방식에 의한 것으로 압력조건이 500~2,500bar임을 특징으로 하는 미세 유화 입자의 제조방법.

청구항 9.

제 5항에 있어서, 상기 레시틴의 함유량이 미세 유화 입자 총중량에 대하여 0.5~10중량%이며, 레시틴의 구성성분이 포스파티딜콜린, 라이조포스파티딜콜린 또는 포스파티딜에탄올아민으로 이루어진 불포화 콜린계 화합물, 세린계 화합물, 에탄올아민계 화합물 또는 이들의 수소첨가물 형태임을 특징으로 하는 리포솜을 포함한 미세 유화 입자의 제조방법.

청구항 10.

제 5항에 있어서, 상기 보조유화제가 음이온계, 양이온계, 비이온계 또는 양성이온계 유화제이며, 사용되는 레시틴 함량 대비 0.1~10배의 비율로 사용함을 특징으로 하는 미세 유화 입자의 제조방법.

청구항 11.

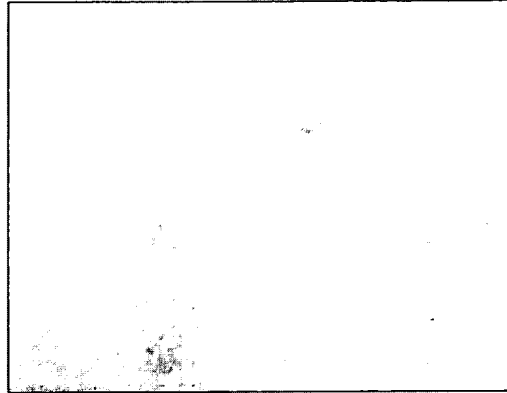
제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 의하여 제조된 미세 유화 입자를 10^{-8} ~ 99.99중량%의 비율로 함유하는 피부 노화 방지용 피부 외용제 조성물.

청구항 12.

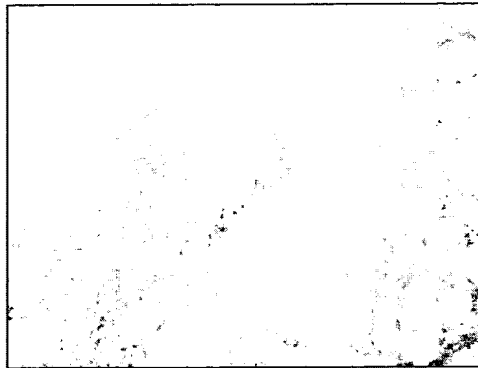
제 11항에 있어서, 상기 피부외용제는 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일 및 보디에센스, 메이크업 베이스, 파운데이션, 염모제, 샴푸, 린스, 보디 세정제, 치약, 구강청정액, 연고, 패치 또는 분무제로 제형화됨을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

도면

도면1



도면2



BEST AVAILABLE COPY